ПАРАЗИТОЛОГИЯ, I, 2, 1967

УДК 576.895.771

О МЕТОДАХ СБОРА И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИЧИНОК КРОВОСОСУЩИХ МОКРЕЦОВ (DIPTERA, CERATOPOGONIDAE)

В. М. Глухова

Зоологический институт АН СССР, Ленинград

Для решения ряда вопросов систематики и биологии мокрецов и построения их естественной системы недостаточно знания только взрослой фазы развития. Необходимо знание личинок и куколок. Выяснение роли мокрецов как переносчиков трансмиссивных болезней сельскохозяйственных животных и человека вызывает необходимость культивирования мокрецов в лабораторных условиях. Однако методы сбора личинок мокрецов и культивирования их в лаборатории еще слабо разработаны.

Все зарубежные и отечественные авторы работ по мокрецам пользовались выборкой личинок из небольшой части пробы после ее отмучивания и промывания через систему сит с ячеей разных размеров для освобождения от посторонних частиц. Эта методика очень трудоемка и не гарантирует полного сбора личинок из пробы.

Джафаровым (1964) применялся, кроме того, метод сбора личинок, основанный на принципе Кирьяновой (1950) для выбора почвенных нематод. Проба помещалась в колбу, стеклянное дно которой было заменено мельничным газом. Колбу ставили в кювету с водой, на которую был направлен свет. В результате почти все живые личинки через 10—20 мин. оказывались в кювете. В наших опытах эта методика оказалась малоэффективной.

Наиболее рациональный метод сбора личинок мокрецов был предложен английскими авторами Кетлом и Лоусоном (Kettle a. Lawson, 1952). Они просматривали остаток от пробы после промывания через два сита в насыщенном растворе (25—33%) сернокислого магния. Личинки в этом растворе всплывают на поверхность и могут быть легко собраны.

Нами были внесены небольшие изменения в этот метод. Взятые пробы отделяли в тазу от растительных и прочих остатков и процеживали через одно сито с ячеей около 3—4 мм. После тщательного отцеживания воды в сите-промывалке из мельничного газа (Джафаров, 1964) пробы помещали в 50%-й раствор сернокислого магния в небольшом цилиндрическом или коническом сосуде. Использованный раствор процеживали, упаривали и вновь использовали для просмотра проб. Всплывшие на поверхность личинки мокрецов могут быть собраны пипеткой или препаровальной иглой. Для отмывания от сернокислого магния личинок переносят в небольшие сосуды с водой. При высокой численности личинок для их отмывания удобнее пользоваться маленькими сачками из мельничного газа (№ 35 и выше) типа аквариумных. Сачок с личинками опускают в широкий сосуд с чистой водой. Отмытых личинок фиксируют или помещают в среду для выращивания.

Фиксировать личинок лучше всего 96° спиртом или формалином, а также специальными фиксаторами (Буэн, Джильсон и др.). Часть личинок необходимо фиксировать кипящим 96° спиртом, так как при этом у многих из них выдвигаются анальные папиллы, а у некоторых выбрасывается передняя часть кишечного тракта и гипофаринкс, строение которого используется в систематике личинок.

Применение сернокислого магния значительно ускоряет сбор личинок в пробе и выявляет наиболее полно личинок, что особенно важно в случаях небольшой численности личинок в пробах.

Методика культивирования мокрецов, за исключением группы *nubeculosus*, очень слабо разработана. Одной из причин этого является полное отсутствие работ по питанию и составу пищи личинок кровососущих мокрецов. Считается, что личинки мокрецов питаются детритом.

Нами было просмотрено содержимое кишечника нескольких экземпляров личинок *Culicoides puncticollis* и одновременно исследованы илы, в которых жили личинки. Оказалось, что в кишечнике был примерно тот же набор бактерий, что и в иле, но концентрация их была во много раз выше. Это дает основание предположить, что личинки выбирают бактериальную флору из среды, а не просто пропускают через кишечник среду.

Имеющиеся в литературе работы по культивированию касаются лишь группы *nubeculosus* (Jones, 1957, 1960, 1964; Megahed, 1956). Правда, ряд авторов содержали личинок мокрецов на естественной среде, но выход взрослых был чрезвычайно мал.

Искусственная среда для воспитания личинок мокрецов *C. nubeculosus* была впервые применена Мегахедом (Megahed, 1956). Она состояла из естественной среды, взятой из мест выплода, высушенной и просеянной (50 г), 6 г сухих измельченных дрожжей и 4 г измельченного древесного угля. Этой смесью слоем в 4 мм заполняли плоские глиняные чашки, заливали водой так, чтобы отдельные неровности выступали из воды, и держали до готовности в течение 3 недель. После этого в них помещали от 70 до 220 яиц. Среду постоянно увлажняли.

Методику массового культивирования *C. variipennis*, очень близкого к *C. puncticollis*, разработал Джонс (Jones, 1957, 1960). Личинки воспитывались в эмалированных кюветах на среде, состоящей из 1 л свежего коровьего навоза, 2 л земли, 2 л воды и пакетика сухих дрожжей. В последней работе Джонса (Jones, 1964) среда была изменена: вместо естественной — использовали вермикулит и добавляли свежий коровий навоз. Молев (1956) использовал для воспитания личинок конский и коровий навоз.

Нами были поставлены опыты по воспитанию мокрецов от яйца до взрослого на среде Мегахеда следующих 13 видов *Culicoides*: *C. nubeculosus*, *C. riethi*, *C. puncticollis*, *C. stigma*, *C. circumscriptus*, *C. pulicaris*, *C. impunctatus*, *C. fascipennis*, *C. pallidicornis*, *C. subfascipennis affinis*, *C. maritimus affinis*, *C. obsoletus*, *C. saevus* и 1 вида *Leptoconops* sp.

Яйца во всех случаях были получены от самок, насосавшихся на сельскохозяйственных животных, и собраны методом учетного полога и на свет.

Напившиеся крови самки находились в специальных садках из латунной сетки диаметром 2 и высотой 4 см со съемными крышкой и дном (Глухова, 1956, 1962) или в садках из мельничного газа, натянутого на металлический каркас. Длина такого садка 6—7, диаметр 4 см; верхняя часть стягивается ниткой и в отверстие вставляется стеклянная трубочка диаметром около 1 см. Конец трубочки закрывается ватой. Эти садки удобны для сбора насосавшихся самок со стенок полога, доставки их в лабораторию и содержания в них самок до момента созревания яиц.

В качестве углеводной подкормки использовали растворы сахара или меда. Небольшие шарики ваты смачивали этим раствором и помещали на крышку садка из сетки или же в углубление, образованное верхней частью садка из мельничного газа. Садки находились в кристаллизаторах, выстланных влажной фильтровальной бумагой.

Для получения яйцекладки самок со зрелыми яйцами переносили в стеклянные пробирки с плоским дном длиной 8.5 и диаметром 2.5 см.

Дно пробирки закрывали плотно утрамбованным слоем ваты высотой в 0.5—1 см, увлажняли 5—6 каплями воды. Слой ваты сверху был прикрыт кружком фильтровальной бумаги, на которую и откладывались яйца. Закрывали пробирку рыхлой ватной пробкой. Эти пробирки особенно удобны в тех случаях, когда нужно получить кладку отдельно от каждой самки. Замечено, что яйца откладываются более охотно, если в пробирке несколько самок. Откладка производится на любую влажную поверхность. Процент самок со зрелыми яйцами, дающих яйцекладки в лабораторных условиях, сильно варьирует у разных видов. В группе *nubeculosus* более 95% самок откладывают яйца. При этом нередко самки из природы откладывают неоплодотворенные яйца. Так, из 25 насосавшихся на корове самок *C. nubeculosus*, собранных 20 мая 1963 года в Чугуевском районе Харьковской области, 10 отложили неоплодотворенные яйца, отличавшиеся более светлой окраской; отрождения личинок из них не произошло. У *C. circumscriptus* яйца откладывали в среднем 80% самок, у *C. pulicaris* и *C. fascipennis* — 70, *C. grisescens* — 50, у других видов — не больше 10%.

Особо следует отметить *C. obsoletus*. Этот вид нами отлавливался в массе. Было использовано в опытах более 10 тысяч самок, однако получено всего около сотни яйцекладок, т. е. 1%. Наши данные по этому виду близки к данным Джамнбека (Jamnback, 1961). Столь же неохотно откладывали яйца и самки *Leptoconops* sp. Влажная фильтровальная бумажка в пробирке складывалась так, чтобы по краям получались фестоны. В эти складочки и откладывались яйца. Погибшие и не отложившие яиц самки вскрывались, и было установлено, что у самок всех видов, за редкими исключениями, были зрелые яйца. От нескольких самок *C. obsoletus*, *C. pallidicornis* и *C. subfascipennis aff.* яйца были получены после обезглавливания самки. Из яиц затем отродились вполне жизнеспособные личинки. Наибольшее число кладок, которое удалось получить от одной самки, равнялось 3 для *C. nubeculosus*, 2 для *C. pulicaris* и *C. fascipennis*.

Сроки созревания яиц у разных видов различны. У содержавшихся при 22—24° самок *C. nubeculosus*, *C. riethi*, *C. puncticollis* яйца созревали на 3-й день, у *C. pulicaris* — на 5-й, *C. obsoletus* — на 6-й, *C. fascipennis* — на 7-й, *C. pallidicornis* — на 6-й, *C. subfascipennis aff.* —на 7-й день. Сроки отрождения личинок из яиц также имеют видовые отличия.

Кладки содержались в одинаковых условиях и были получены примерно в одни и те же сроки: у группы *nubeculosus* отрождение из яиц наблюдалось на 3-й день, у *C. pulicaris* — на 5-й, у *C. fascipennis* — на 7-й, у *C. pallidicornis* — на 10-й, у *C. obsoletus* — на 7-й; сроки созревания яиц и отрождения личинок приведены по материалам из Харьковской обл.

Размеры яиц и интенсивность окраски варьируют даже в пределах одной группы. Так, яйца *C. fascipennis* узкие и длинные и очень темные, а у *C. pallidicornis* они короче, толще и светлые, почти песочного цвета. По мере созревания оболочка яйца становится светлее у всех видов и у зрелых яиц глаза личинки видны сквозь нее. Полученные яйцекладки вместе с кружком фильтровальной бумаги во всех случаях до отрождения личинок содержались в часовых стеклах, поставленных в чашки Петри, дно которых было выстлано влажной фильтровальной бумагой для предохранения от высыхания.

Среда Мегахеда была несколько изменена путем внесения небольшого количества невысушенной естественной среды для развития неспороносных форм бактерий (погибающих при высушивании) и создания более полноценного пищевого комплекса для личинок. Подготовленная среда раскладывалась тонким слоем в чашках Петри, заливалась водой и стояла в течение 2—3 недель. К этому времени запах гниющих дрожжей исчезал. Чашки Петри со средой содержались в марлевых садках или просто накрывались марлей для защиты от мух и *Psyhodidae*, охотно откладывающих яйца в такую среду. Потомство каждой самки воспитывалось отдельно. В опытах было использовано около 800 кладок. Наилучшие результаты получены для группы *nubeculosus*. Свыше 90% кладок удалось довести до имаго. Часть личинок фиксировалась, часть оставлялась для окукления. Полученные имаго были вполне жизнеспособными и по размерам не уступали, а в некоторых случаях превышали размеры исходной особи. В среднем 80% личинок развивалось до IV стадии.

Успешно развивались на среде Мегахеда личинки *C. circumscriptus*, хотя процент развившихся кладок и число особей из одной кладки были ниже, чем в группе *nubeculosus*. Следующими видами, для развития которых среда Мегахеда оказалась благоприятной, были *C. pulicaris* и *C. fascipennis*. Свыше 80% кладок *C. fascipennis* и *C. pulicaris* развивалось до взрослой фазы. Количество зрелых личинок в каждой кладке равнялось у *C. pulicaris* 50%, у *C. fascipennis* — 60%. Что касается *C. pallidicornis*, *C. subfascipennis affinis*, *C. maritimus affinis*, то среда Мегахеда является для них бесспорно менее благоприятной. Однако небольшое число полученных кладок этих видов не дает возможности привести достаточные количественные данные.

Для прочих видов: *C. obsoletus*, *C. impunctatus*, *C. saevus*, *Leptoconops* sp. среда Мегахеда практически непригодна. Из нескольких десятков кладок *C. obsoletus* и *C. saevus* лишь единичные удалось довести до личинок IV стадии. А личинки *C. impunctatus* и *Leptoconops* sp. после достижения II стадии погибали. Естественная среда, смешанная со свежим коровьим навозом, была использована для воспитания личинок *C. grisescens*, *C. obsoletus* и *C. impunctatus*. Лучше всего развивались личинки *C. grisescens*. Удалось воспитать до IV стадии небольшое количество личинок *C. impunctatus*. *C. obsoletus* на этой среде развивались несколько лучше, чем на среде Мегахеда, причем в неглазированных глиняных чашках развитие шло лучше, чем в чашках Петри.

При массовом культивировании мокрецов возникает ряд дополнительных трудностей, главная состоит в том, что среды Мегахеда и Джонса очень трудно сделать стандартными, ибо состав микрофлоры в различных естественных субстратах, служащих основой, различен. Для воспитания таких эврибионтных видов, как *C. nubeculosus*, *C. riethi*, *C. puncticollis*, *C. stigma*, *C. pulicaris*, *C. fascipennis* это не столь важно. А для более специализированных видов, какими являются *C. pallidicornis*, *C. obsoletus*, *C. impunctatus* и др., очень важно иметь пригодную для развития стандартную среду.

В целях стандартизации среды была предпринята попытка воспитания личинок на пленке Azotobacter sp., выделенного в лаборатории микробиологии Зоологического института АН СССР и выращенной на среде Федорова. Azotobacter выбрали потому, что для ряда беспозвоночных он оказался наиболее полноценным пищевым материалом (Родина, 1949).

Первоначально были взяты личинки *C. nubeculosus* и *C. puncticollis* III стадии и помещены в часовые стекла с водой и пленкой Azotobacter sp. Личинки интенсивно питались, достигли IV стадии, окуклились и дали жизнеспособных взрослых. В чашки Петри со средой Мегахеда, где она была очень обеднена из-за высокой плотности личинок, добавляли пленку Azotobacter sp. Личинки сразу же передвигались к кусочкам пленки и охотно поедали ее, что было хорошо заметно под бинокуляром. Когда в чашки Петри с личинками добавляли одновременно пленку Azotobacter sp. и небольшие кусочки свежей среды Мегахеда, то личинки одинаково охотно питались тем и другим. Кроме того, был поставлен опыт с новорожденными личинками *C. puncticollis*. Они содержались в часовом стекле с водой и пленкой Azotobacter sp. Личинки питались, были очень активными, линяли, нормально развивались до III стадии. После этого наблюдений провести не удалось и окончательные результаты остались неясными. Личинки *C. pulicaris* содержались в воде на сухом порошке Azotobacter sp. Они развились до IV стадии. Окукления не наблюдалось.

Для окончательных выводов о пригодности Azotobacter sp. как пищевого материала для лабораторного культивирования личинок необходимо продолжить опыты. Однако сейчас уже ясно, что для доращивания личинок, собранных в природе, до IV стадии Azotobacter sp. незаменим, особенно в тех случаях, когда необходимо сохранить личиночную шкурку. Последнюю вследствие прозрачности тела можно заметить лишь по окрашенной головной капсуле. И даже самое небольшое количество темноокрашенной среды не позволяет найти шкурку личинки IV стадии, не говоря уже о младших стадиях.

Использование небольших кусочков пленки Azotobacter sp. позволило получить шкурки личинок группы *nubeculosus*, *C. pulicaris*, *C. grisescens*, *C. fascipennis*, *C. circumscriptus*, *C. salinarius*, *C. machardyi*, *C. manchuriensis*.

Таким образом, наиболее легко культивируемой группой является группа *nubeculosus* (а внутри нее — *C. nubeculosus*, *C. riethi*, *C. puncticollis*; *C. stigma* неохотно копулирует в неволе).

На среде Мегахеда или Джонса можно успешно культивировать виды, местами выплода которых служат илистые биотопы, загрязненные органическими остатками.

Литература

Глухова В. М. 1956. Фауна и экология мокрецов (Culicoides) Карело-Финской ССР. Канд. дисс. Зоол. инст. АН СССР : 1—151.

Глухова В. М. 1962. Кровососущие мокрецы (Diptera, Heleidae) Карелии. Тр. ЗИН АН СССР, 31 : 197—249.

Джафаров Ш. М. 1964. Кровососущие мокрецы Закавказья. Баку : 3—413.

Кирьянова Е. С. 1950. Сбор и изучение галловой и других растениеядных нематод, М.—Л. : 3—48.

Молев Е. В. 1956. К экологии фаз развития кровососущих насекомых рода Culicoides (Diptera, Heleidae). Зоол. журн., 35 (3) : 412—418.

Родина А. Г. 1949. Бактерии как пища водных животных. Природа, 10 : 23—26.

Jamnback H. 1961. Obesrvation on Culicoides obsoletus (Meigen) in the laboratory (Diptera : Ceratopogonidae). Mosquito News, 21 (1) : 48—53.

Jones R. H. 1957. The laboratory colonization of Culicoides variipennis (Coq.) Journ. Econ. Entomol., 50 (10) : 107—108.

Jones R. H. 1960. Mass-production methods for colonization of Culicoides variipennis sonorensis. Journ. Econ. Entomol., 53 (5) : 731—735.

Jones R. H. (Джоунс Р.). 1964. Методы массового разведения Culicoides variipennis (Coquilett). Бюлл. Всемирн. организ. здравоохр., 31, 4 : 586—588.

Kettle D. S. a. Lawson J. W. H. 1952. The early stages of British biting midges Culicoides Latreille (Diptera : Ceratopogonidae) and allied genera. Bull. Entom. Res., 43 (3) : 421—467.

Megahed M. M. 1956. A culture method for Culicoides nubeculosus Meigen (Diptera : Ceratopogonidae) in the laboratory, with notes on the biology. Bull. Ent. Res., 47 (1) : 107—114.

ON THE TECHNIQUE OF COLLECTING AND CULTIVATION OF LARVAE OF BLOODSUCKING MIDGES (DIPTERA, CERATOPOGONIDAE)

V. M. Glukhova

SUMMARY

The most efficient technique of collecting larvae in nature is the examination of samples, taken from breeding sites, in the saturated (50%) solution of magnesium sulphate ($MgSO_4$). The larvae of the following 13 species of *Culicoides* and of one species of *Leptoconops* sp. were reared on the Megahead's medium: *C. nubeculosus*, *C. riethi*, *C. puncticollis*, *C. stigma*, *C. circumscriptus*, *C. pulicaris*, *C. impunctatus*, *C. fascipennis*, *C. pallidicornis*, *C. subfascipennis affinis*, *C. maritimus affinis*, *C. obsoletus*, *C. saevus*.

The best results were obtained for the *nubeculosus* group. *C. circumscriptus*, *C. pulicaris*, *C. fascipennis* are also may be cultivated on Megahead's medium. As to *C. pallidicornis*, *C. subfascipennis affinis*, *C. maritimus affinis*, *C. obsoletus* and *C. saevus* only single clutches were reared on this medium. For *C. impunctatus* and *Leptoconops* sp. this medium is absolutely unsuitable.

The tests were undertaken on rearing larvae on the film of Azotobacter sp. We succeeded in cultivating larvae of *nubeculosus* group from III stage to adults and from I to III stage, larvae of C. pulicars from I to IV stage on the powder of Azotobacter sp.

Azotobacter is indispensable in rearing larvae of III and IV stages, collected in nature, to adults.